

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-371063

(43)Date of publication of application : 26.12.2002

(51)Int.Cl.

C07D213/79
C07D213/16
C12P 17/12
// C12N 15/09
(C12P 17/12
C12R 1:185)
(C12P 17/12
C12R 1:13)
(C12P 17/12
C12R 1:15)
(C12P 17/12
C12R 1:07)
(C12P 17/12
C12R 1:01)
(C12P 17/12
C12R 1:425)
(C12P 17/12
C12R 1:80)
(C12P 17/12
C12R 1:85)

(21)Application number : 2002-085077

(71)Applicant : TORAY IND INC

(22)Date of filing : 26.03.2002

(72)Inventor : SAWAI HIDEKI
NAGAO ERIKO
YAMADA MASANARI
ECHIGO YUJI

(30)Priority

Priority number : 2001098889 Priority date : 30.03.2001 Priority country : JP

(54) 2,6-PYRIDINECARBOXYLIC ACID OR ITS SALT, METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND CHELATING AGENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain 2,6-pyridinedicarboxylic acid containing impurities which are also excellent in biodegradability.

SOLUTION: A chelating agent having little load to the environment is provided by obtaining 2,6-pyridinedicarboxylic acid synthesized by microorganisms and which is excellent in biodegradability. The 2,6-pyridinedicarboxylic acid is obtained from an intermediate by modifying a lysine-biosynthetic pathway of a microorganism. As the microorganism, a strain capable of producing a large amount of lysine is preferably used e.g. it is preferable to use bacteria classified to Brevibacterium and Corynebacterium.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-371063

(P2002-371063A)

(43) 公開日 平成14年12月26日 (2002. 12. 26)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
|--------------------------------------|-------|----------------|--------------|
| C 0 7 D 213/79 | | C 0 7 D 213/79 | 4 B 0 2 4 |
| 213/16 | | 213/16 | 4 B 0 6 4 |
| C 1 2 P 17/12 | | C 1 2 P 17/12 | 4 C 0 5 5 |
| // C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 R 1:185 | |
| (C 1 2 P 17/12 | | 1:13 | |
| 審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 14 頁) 最終頁に続く | | | |

(21) 出願番号 特願2002-85077(P2002-85077)
(22) 出願日 平成14年3月26日 (2002. 3. 26)
(31) 優先権主張番号 特願2001-98889(P2001-98889)
(32) 優先日 平成13年3月30日 (2001. 3. 30)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000003159
東レ株式会社
東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
(72) 発明者 澤井 秀樹
愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東
レ株式会社名古屋事業場内
(72) 発明者 永尾 絵梨子
愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東
レ株式会社名古屋事業場内
(72) 発明者 山田 勝成
愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東
レ株式会社名古屋事業場内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2, 6-ピリジンジカルボン酸またはその塩、製造方法ならびにキレート剤

(57) 【要約】

【課題】 含まれる不純物も生分解性に優れる2,6-ピリジンジカルボン酸を提供する。

【解決手段】 微生物によって合成された生分解性に優れる2,6-ピリジンジカルボン酸を提供することで、環境に低負荷なキレート剤を提供する。微生物によって合成された生分解性に優れる2,6-ピリジンジカルボン酸を提供することで、環境に低負荷なキレート剤を提供する。微生物のリジン生合成経路を改変することにより、その中間体から2,6-ピリジンジカルボン酸を得ることができる。微生物としては、リジンを多量に生産する菌株を用いることが有用で、例えばブレビバクテリウム (Brevibacterium) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属に分類される細菌を用いることが望ましい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルキルピリジンの含有量が2重量%以下であることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩。

【請求項2】 アルキルピリジンが2,6-ジメチルピリジンおよび/または6-メチル-2-ピリジンカルボン酸であることを特徴とする請求項1に記載の2, 6-ピリジンジカルボン酸またはその塩。

【請求項3】 バリン、アラニン、 α -ケトグルタル酸および2,3-ジヒドロジピコリン酸から選ばれる少なくとも一つを不純物として含むことを特徴とする請求項1または2に記載の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩。

【請求項4】 バリン、アラニン、 α -ケトグルタル酸および2,3-ジヒドロジピコリン酸から選ばれる少なくとも一つを不純物として含むことを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩。

【請求項5】 胞子を形成する能力がなく、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法。

【請求項6】 微生物が、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属およびセラチア (*Serratia*) 属から選ばれるいずれか一つの属に属する微生物であることを特徴とする請求項5に記載の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法。

【請求項7】 生育にリジンまたはリジン生合成系中間体を要求し、かつ、2, 6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液上清から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法。

【請求項8】 ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC 1.3.1.26) が、欠損、変異または破壊された微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液上清から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法。

【請求項9】 ジピコリネートシンターゼ (*dipicolinate synthase*) をコードする遺伝子を導入した形質転換体を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液上清から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法。

【請求項10】 微生物が、エシェリヒア (*Escherichia*)

a) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、およびサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属から選ばれるいずれか一つの属に属する微生物であることを特徴とする請求項7から9のいずれか1項に記載の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法。

【請求項11】 2, 6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を含むキレート剤であって、生分解性が98%以上であるキレート剤。

【請求項12】 請求項1から4のいずれか1項記載の2, 6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を含むキレート剤。

【請求項13】 請求項5～10のいずれか1項記載の製造方法で得られる2, 6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を含むキレート剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、実質的にアルキルピリジン類を不純物として含まない優れた生分解性を有する2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩とその製造方法およびそれらを用いたキレート剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 2,6-ピリジンジカルボン酸は、2,6-ルチジンから酸化反応によって合成されることが知られている。すなわち、ニッケル化合物の存在下で次亜ハロゲン酸塩を酸化剤として用いる方法 (特開平11-322716号公報) や、オゾンを用いた酸化による製造方法 (特開平11-343483号公報、SU943236A1)、電解酸化法 (EP253439B1)、空気酸化法 (*Synthesis Commun.* (1992), 22, 2691-6) などが開示されている。しかし、これらの方法では、反応の転化率や選択率が不十分なため、原料である2,6-ルチジンや反応中間体である6-メチル-2-ピリジンカルボン酸が反応液中に残存し、これらが製品である2,6-ピリジンジカルボン酸中に不純物として混入するという問題点があった。

【0003】 2,6-ピリジンジカルボン酸は、漂白促進剤 (特開平6-214365号公報、米国特許第5536625号公報) や金属隠蔽剤 (特開平5-158195号公報) として、写真処理用途や各種洗浄剤で使用されることが知られている。2,6-ピリジンジカルボン酸は、天然物であり生分解性が高いことが知られているが、不純物として含まれる2,6-ルチジンや6-メチル-2-ピリジンカルボン酸の生分解性が悪いことから、大量に使用された場合には、環境保護の観点から問題となっている。

【0004】 微生物を用いた2,6-ピリジンジカルボン酸の製造方法としては、胞子を形成する微生物であるバシラス (*Bacillus*) 属を用いた発酵法による製造方法 (DE

10

20

30

40

50

2300056)やカビを用いた製造方法(米国特許第3334021号公報)が知られているが、胞子を形成する能力を持たない微生物による2,6-ピリジンジカルボン酸の生産は、これまで知られていなかった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】金属隠蔽剤や補足剤は、その使用状況から環境へ放出されることが多く、生分解性に優れた製品が望まれている。2,6-ピリジンジカルボン酸は、微生物の胞子中に存在する天然のキレート作用を持つ物質として知られていた。こうした背景から、安価で、かつ、生分解性に優れた2,6-ピリジンジカルボン酸が望まれていた。

【0006】すなわち、本発明は、生分解性に優れた2,6-ピリジンジカルボン酸に関するものであり、その製造方法およびその用途を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者はかかる状況に鑑み、創意工夫の結果、リジンおよびリジン生合成系中間体を生育に要求する微生物が、2,6-ピリジンジカルボン酸を著量に生産し、また、こうした微生物を用いて得られた2,6-ピリジンジカルボン酸精製物が、極めて生分解性が高いことを見出し本発明を完成した。すなわち、本発明は、リジンおよびリジン生合成系中間体を生育に要求する微生物が、著量の2,6-ピリジンジカルボン酸を生産するという発見によって、安価にかつ大量に2,6-ピリジンジカルボン酸を製造する新規な製造方法を提供するものである。また、本発明で得られる2,6-ピリジンジカルボン酸に含まれる不純物は、アミノ酸や有機酸および2,3-ジヒドロジピコリン酸などであり、これらはいずれも生分解性に優れており、環境中では速やかに分解される。

【0008】すなわち上記課題は、実質的にアルキルピリジンを不純物として含まない生分解性に優れた2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を提供することとその製造方法およびその使用方法を提供することによって解決された。

【0009】すなわち、本発明は、

(1) アルキルピリジンの含有量が2重量%以下であることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩。

(2) バリン、アラニン、 α -ケトグルタル酸および2,3-ジヒドロキシピコリン酸から選ばれる少なくとも一つを不純物として含むことを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩。

(3) 胞子を形成する能力がなく、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸の製造方法

(4) 生育にリジンまたはリジン生合成系中間体を要

求し、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液上清から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸の製造方法

(5) ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ(EC1.3.1.26)が、欠損、変異または破壊された微生物を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液上清から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸の製造方法。

(6) ジピコリネートシンターゼ(dipicolinate synthase)をコードする遺伝子を導入した形質転換体を増殖させる工程と、その菌体の培養上清または反応水溶液上清から2,6-ピリジンジカルボン酸を回収、精製する工程からなることを特徴とする2,6-ピリジンジカルボン酸の製造方法。

(7) 2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を含むキレート剤であって、生分解性が98%以上であるキレート剤。

(8) 上記の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を含むキレート剤。

(9) 上記の製造方法で得られる2,6-ピリジンジカルボン酸を含むキレート剤。

【0010】から構成されるものである。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明に関し詳細に説明する。

【0012】本発明において提供される2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩は、実質的にアルキルピリジンを不純物として含まないものであり、アルキルピリジンの含有量が2重量%以下のものである。さらに好ましくは、含有量が0.5重量%以下のものである。

【0013】アルキルピリジンとは、例えば、2,6-ジメチルピリジンや6-メチル-2-ピリジンカルボン酸、3,5-ジメチルピリジン、5-メチル-3-ピリジンカルボン酸、2,5-ジメチルピリジン、5-メチル-2-ピリジンカルボン酸などが挙げられる。これら、アルキルピリジンは生分解性が悪く、環境に放出された場合は土壌、河川、湖沼などに蓄積しやすく、環境保護の観点から好ましくない。しかしながら、従来、工業的に生産されていた2,6-ピリジンジカルボン酸には、微量ながらアルキルピリジンが不純物として含まれている。従って、従来の2,6-ピリジンジカルボン酸を大量に使用した場合、これら不純物が蓄積することで環境に悪影響を及ぼすことが懸念される。

【0014】2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩に含まれるアルキルピリジンは、HPLCなどを用いて簡単に定量することができる。例えば、カラムとしてTSK-gel ODS-80TM(東ソー社製)、溶離液とし

て0.1%リン酸と0.1%トリエチルアミンを含む水と0.1%リン酸と0.1%トリエチルアミンを含むメタノールを85:10に混合した溶液を用いて、検出波長254nm、流速1ml/分の条件で分析することで、2,6-ピリジンジカルボン酸中の含量が0.05%以上のアルキルピリジンを定量することができる。すなわち、本発明のアルキルピリジンの含有量が2重量%以下の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩とは、2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の粉末がすべて溶解する適切な溶媒に溶解した後、HPLCなどの分析によって2重量%を超えるアルキルピリジンを含まないようなものをいう。

【0015】また、本発明は生分解性の高い不純物を含む2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を提供する。生分解性の高い不純物とは例えば、アミノ酸、核酸、タンパク質、多糖など、天然に生産されているような物質は、本来生分解性が良好であることから、不純物として含まれてもかまわない。これらの不純物は、安価に製造する目的で簡便な精製法を採用することによって含まれることもあるし、また、2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を用いる用途に応じて、安定性を付与したり機能を向上させる目的のために人為的に添加されることもあり得る。

【0016】特に、バリン、アラニンなどのアミノ酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、乳酸などの有機酸や2,3-ジヒドロジピコリン酸などは、2,6-ピリジンジカルボン酸のキレート作用を妨害することなく、またこれらが含まれることは、安価な2,6-ピリジンジカルボン酸の製造を容易にすることができると考えられる。本明で提供される2,6-ピリジンジカルボン酸に含まれ得るアミノ酸、有機酸、核酸、タンパク質、多糖などの定量は、それぞれの化合物に応じた適切な定量法を採用することで実施可能である。例えば、バリン、アラニンなどのアミノ酸は、全自動アミノ酸分析計（日本電子製）を用いて測定することができる。有機酸はHPLCで定量可能であるし、核酸は加水分解後にHPLCを用いて定量することができる。タンパク質はローリー法、多糖はアンズロン硫酸法などによって定量することができる。

【0017】本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸はアルキルピリジンの含有量が少なく、かつ、バリン、アラニン、 α -ケトグルタル酸のいずれか一つを不純物として含むものが好ましい。

【0018】本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸の塩としては、ナトリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩などがあげられる。

【0019】本発明で提供する2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩の製造方法には、特に制限はないが、微生物を用いた発酵法あるいは微生物菌体を用いた菌体反応法で製造することが好ましい。本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸を製造する目的で使用される微生物には以

下のようなものがある。

【0020】一つは、胞子を形成する能力がない微生物で、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を菌体外に分泌する能力のある微生物である。こうした微生物は、例えば、胞子を形成する能力がない微生物を親株として、通常の変異処理によって得られる2,6-ピリジンジカルボン酸を分泌する能力を持つ変異株を分離することで得られる。変異株の誘導は、親株を紫外線照射するか、あるいは変異誘発剤（例えば、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホン酸等）で処理した後、天然培地などの良好に生育する寒天培地で純化した後、良好に生育する培地を用いて培養した培養上清中の2,6-ピリジンジカルボン酸を定量し、有意に2,6-ピリジンジカルボン酸を培養上清中に蓄積する変異株を選抜することによって得ることができる。また、2,6-ピリジンジカルボン酸を分泌する変異株は、変異処理した菌体を、十分量の鉄イオンを含む最少培地に塗布し、生じたコロニーのうち赤く着色したものを選ぶことによっても得ることができる。

【0021】ここで、胞子を形成する能力のない微生物としては、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、プロビデンシア (*Providencia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属などがあげられ、とくに、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属が好ましい。

【0022】二つ目の微生物は、生育にリジンまたはリジン生合成系中間体を要求し、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物である。ここで、リジンまたはリジン生合成系中間体に対する要求性とは、いわゆるリーキータイプの要求性株も含むものである。こうした微生物は、親株を上記のように通常の変異処理をした後、通常の栄養要求性変異株の取得方法に従って得ることができる。すなわち、変異処理した菌体を天然培地などの良好に生育する寒天培地上でコロニーを形成させる。これらコロニーを、リジンまたはリジン生合成系中間体を含む最少寒天培地とリジンまたはリジン生合成系中間体を含まない最少寒天培地にレプリカする。リジンまたはリジン生合成系中間体を含む最少培地上にのみ生育するコロニーを取得することによって、リジンまたはリジン生合成系中間体を生育に要求する変異株を得ることができる。得られたリジンまたはリジン生合成系中間体要求性変異株を純化した後、良好に生育する培地を用いて培養した培養上清中の2,6-ピリジンジカルボン酸を定量し、親株より有意に2,6-ピリジンジカルボン酸を培養上清中に蓄積する変異株を選抜することによって得ることができる。

【0023】ここで、生育にリジンまたはリジン生合成系中間体を要求する微生物として、ジヒドロジピコリン

10

20

30

40

50

酸レダクターゼ (EC1.3.1.26) が、欠損、変異または破壊された微生物を用いることができる。

【0024】生育にリジンまたはリジン生成系中間体を要求し、かつ2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物としては、特に制限はないが、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、プロビデンスシア (*Providencia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に属する微生物のうちいずれか一つの微生物を使用することが工業的に有利である。

【0025】3つ目は、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC1.3.1.26) が、欠損、変異または破壊された微生物である。当該酵素の欠損、変異または破壊は、上記に述べた変異処理によって行うこともできるが、遺伝子組換え技術を用いて行うことでよりの確に実施できる。すなわち、目的とする微生物のジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子を通常の分子生物学的手法によってクローニングした後、その遺伝子に対して人為的に欠損または変異を導入する。この変異の導入は、制限酵素やDNA修飾酵素を使用した遺伝子配列の欠損や異種遺伝子の挿入、亜硝酸などの変異剤による変異の導入、PCRを用いた変異の導入などによって実施することができる。こうして改変されたジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子は、通常形質転換に使用されるベクターに挿入し、通常の方法によって、目的の微生物に形質転換される。得られた形質転換体のうちから、改変されたジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子が、染色体DNAに組み込まれた組換え体を選出することによって、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC1.3.1.26) が、欠損、変異または破壊された微生物を得ることができる。形質転換に使用できるベクターとしては、例えばpUC18、pHSG398などが挙げられ、その他、温度感受性のプラスミド、レプリコンを欠損させた環状DNAなどを用いることもできる。ジヒドロジピコリン酸レダクターゼをコードする遺伝子が、染色体DNAに組み込まれた組換え体を選出するのを容易にする目的で、ある種のマーカー遺伝子を利用することが好適である。例えば、クロラムフェニ

【0026】ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (EC1.3.1.26) が、欠損、変異または破壊された微生物として

は、特に制限はないが、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、プロビデンスシア (*Providencia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に属する微生物のうちいずれか一つの微生物を使用することが工業的に有利である。

【0027】4つ目は、ジピコリネートシンターゼ (dipicolinate synthase) をコードする遺伝子を導入した形質転換体である。ジピコリネートシンターゼ (dipicolinate synthase) をコードする遺伝子は、通常の遺伝子工学的手法を用いて得ることができるが、例えば、ジピコリネートシンターゼ (dipicolinate synthase) をコードする遺伝子配列を元に設計したプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (以下PCRと略す) を行うことによって得ることができる。得られたジピコリネートシンターゼ (dipicolinate synthase) をコードする遺伝子は、通常に用いられる発現ベクターに連結した後、2,6-ピリジンジカルボン酸を分泌する能力を持つ微生物に導入される。得られた形質転換体は、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力獲得するか、または、その生産性が向上する。ジピコリネートシンターゼ (dipicolinate synthase) をコードする遺伝子のリボゾーム結合配列より上流側に、強いまたは構成的に作用するプロモーター領域を結合させる構造を構築することで、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力をさらに向上させることができる。

【0028】ジピコリネートシンターゼ (dipicolinate synthase) をコードする遺伝子を導入した形質転換体としては、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、ブレヴィバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、バシラス (*Bacillus*) 属、プロビデンスシア (*Providencia*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ペニシリウム (*Penicillium*) 属、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属に属する微生物のうちいずれか一つの微生物を使用することが工業的に有利である。

【0029】上記4つの微生物が示す性質を組み合わせることで、さらに2,6-ピリジンジカルボン酸を生産性高く製造することが可能となる。具体的には、例えば、胞子を形成する能力がなく、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物、または、生育にリジンまたはリジン生成系中間体を要求し、かつ、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生する能力を有する微生物の、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼを欠損、変異、または破壊した微生物、あるいは、これらの微生物にジピコリネートシンターゼをコードする遺伝子を導入した微生物などは、より好ましく2,6-ピリジンジカルボン酸の生産に使用することができる。

【0030】本発明で用いる微生物を増殖させる方法に

特に制限はないが、通常の微生物の培養方法を用いることができる。すなわち、使用する培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含む通常の培地である。炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぷんおよびセルロースの加水分解物、糖蜜などの糖類、グリセロール、エタノール、ソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸を用いることができる。窒素源として硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水、尿素などを用いることができる。有機微量栄養源として、ビタミン類、アミノ酸などの要求物質、または、必要に応じて酵母エキス、コーンステープリカーなどを含有させることが望ましい。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、銅イオン、鉄イオン、マンガンイオンなどを添加することが望ましい。場合によっては、消泡剤なども添加される。

【0031】培養は、振盪または通気攪拌によって通常好気条件で16から120時間行うのが好ましい。培養の間pHは4～8に、培養温度は20℃から45℃に制御する。尚、pH調整には、無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガスなどを使用することができる。

【0032】上記のように増殖させた微生物を、アスパラギン酸またはビルビン酸の少なくとも一つを含む水溶液中に懸濁させることで、2,6-ピリジンジカルボン酸を産生させることも可能である。この時、エネルギー源として上記培地に添加されるような物質を共存させることでさらに効率よく2,6-ピリジンジカルボン酸を産生させることが可能である。

【0033】本発明の微生物の培養上清または反応上清液から、2,6-ピリジンジカルボン酸を単離採取するには公知の方法を組み合わせることで実施できる。例えば、イオン交換樹脂による吸脱着、晶析による固液分離、膜処理による不純物の除去などを組み合わせることで、容易に2,6-ピリジンジカルボン酸の結晶または沈殿を得ることができる。

【0034】ここで、イオン交換樹脂処理などによって得られた2,6-ピリジンジカルボン酸を含有する溶液に目的に応じた量のアルカリを添加することで、2,6-ピリジンジカルボン酸の塩を得ることができる。具体的には、NaOHを添加することにより、2,6-ピリジンジカルボン酸ナトリウム塩を得ることができる。

【0035】本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩、あるいは本発明の方法で得られる2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を用いることで、生分解性に優れたキレート剤が得られる。キレート剤の生分解性は、「新規化学物質等に係わる試験方法について

(環保業5号・薬発第615号・49基局第392号)」に従って測定する。本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を含むキレート剤の生分解性は98%以上である。

【0036】得られた2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩は、優れたキレート能を持っており様々な用途に使用可能である。特に、本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸は、含まれる不純物も生分解性があることに特徴があることから、大量に使用されその一部が環境に排出される可能性のある様な用途で使用する際に高い価値を持つ。

【0037】例えば、繊維工業における洗浄・漂白・染色工程で、繊維の損傷や染めムラ、色あせ防止の目的で、使用する水に含まれる金属の遮蔽剤として使用することができる。また、紙パルプ工業においては、漂白工程においてピッチトラブルや紙の変色防止のためにも使用できる。さらに、洗剤に添加することで、その洗浄効果を高めることができる。ボイラーやクーリングタワーの洗浄においては、スケール防止剤として使用できる。写真現像においても、定着液に添加することで写真感光材料の仕上がりを改善することができる。また、写真工業において排出される銀イオンを補足する目的でも使用できる。

【0038】本発明の2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩は、担体に結合させても構わない。担体としては、有機系と無機系があるが、有機系担体としては、天然由来として、アガロース、デキストラン、セルロースなどがあり、合成高分子として、ポリスチレン、ポリアクリルアミドなどがある。無機系担体としては、多孔性シリカゲル、アルミナ、ゼオライト、モンモリナイトが挙げられる。

【0039】これら、担体に2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を担持する場合は、担体表面を化学的に修飾して直接結合させてもよいが、担体と2,6-ピリジンジカルボン酸の間にスペーサー的な役割を持ったものを導入しても良い。

【0040】こうした担体は、円筒形の容器に充填され、固定床の分離カラムとして使用できる。例えば、銀イオンなどの処理では、二本以上のカラムを並列に配列し、一方で銀を補足している間、他のカラムで銀を脱離処理して再生を行うことで、連続的に処理を行うこともできる。

【0041】こうして得られた2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を、キレート剤として写真処理剤、各種洗浄剤に用いることで、大量に使用した場合でも環境に悪影響を与えることがなくなる。

【0042】

【実施例】以下に本発明を実施例を持って説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0043】実施例1 (ジヒドロジピコリン酸レダク

ターゼ (EC1.3.1.26) が欠損した微生物の作製)
 ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) のジヒドロジピコリン酸レダクターゼの遺伝子配列 (参考文献1) を参考に、5'-GC TTCTAGACTGGTGGGCGTTTGA AAA ACT-3' (配列番号: 1) と5'-GCTAAGCTTC ACGCTATCAACTCCACGCTCAAT-3' (配列番号: 2) の2種類のプライマーを合成した。上記各プライマーを20 pmol, 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1.5 mM MgCl₂、25 mM KCl, 100 μg/ml ゼラチン、50 μM 各 dNTP、4 単位 Ex Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) となるように各試薬を加え、全量 100 μl とした。*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 の菌体を少量反応液に加えた後、DNA の変性条件を 94 °C、1 分、プライマーのアニーリング条件を 55 °C、2 分、プライマーの伸長条件を 72 °C、3 分の各条件で、Perkin-Elmer Cetus 社の DNA サーマルサイクラーを用い、30 サイクル反応させた。これを 1% アガロースゲルにて電気泳動し、約 890 bp のジヒドロジピコリン酸レダクターゼの遺伝子を含む DNA 断片を常法 (文献2) に従って調製した。

【0044】この DNA 断片を、制限酵素 XbaI および HindIII で制限酵素処理し、pUC18 (宝酒造 (株) 製) の XbaI-HindIII 部位へ常法に従い挿入し、組換えプラスミド pDAP1 を得た。

【0045】次に、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの遺伝子配列 (文献3) を参考に、5'-ACGGTTCGACTCGCAGAATAAATAAA TCCTGGTG-3' (配列番号: 3) と5'-ATGAG GCCTGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGA-3' (配列番号: 4) の2種類のプライマーを合成した。

【0046】プラスミド pHSG398 (宝酒造 (株) 製) の溶液を 0.5 ml のマイクロ遠心チューブに 2 μl づつ取り、各プライマーを 20 pmol, 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、1.5 mM MgCl₂、25 mM KCl, 100 μg/ml ゼラチン、50 μM 各 dNTP、4 単位 Ex Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造 (株) 製) となるように各試薬を加え、全量 100 μl とした。DNA の変性条件を 94 °C、1 分、プライマーのアニーリング条件を 55 °C、2 分、プライマーの伸長条件を 72 °C、3 分の各条件で Perkin-Elmer Cetus 社の DNA サーマルサイクラーを用い、30 サイクル反応させた。これを 1% アガロースゲルにて電気泳動し、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む約 970 bp の DNA 断片を、常法 (文献2) に従って調製した。得られた DNA 断片を、SalI と StuI で制限酵素処理したのち、1% アガロースゲルにて電気泳動し、DNA 断片 C

AT/SalI, StuI を得た。また、上記 pDAP1 を SalI と StuI で制限酵素処理したのち、1% アガロースゲルにて電気泳動し、ベクター部分の約 2.9 Kbp の DNA 断片 pDAP/SalI, StuI を得た。DNA 断片 CAT/SalI, StuI と DNA 断片 pDAP/SalI, StuI を混合し、常法に従ってライゲーションしたのち、大腸菌 JM109 に形質転換した。得られたアンピシリン耐性の形質転換体から、常法に従ってプラスミド pDP-CAT1 を得た。

【0047】エレクトロポレーション法を用いて、プラスミド pDP-CAT1 を常法どおりに *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 に導入し、形質転換体を得た。

【0048】得られた形質転換体 10 株を選び、表1に示す最少平板培地と最少平板培地に 100 mg/l の L-リジンを加えたリジン添加最少平板培地に塗布し、30 °C で3日間培養した。その結果、すべての形質転換体は、リジン添加最少平板培地でのみ生育が認められた。このことから得られた形質転換体がリジン要求性を有することが確認できた。得られた形質転換体から 10 株を選び、*Brevibacterium lactofermentum* TR-DAP1 から TR-DAP10 と命名した。

【0049】また、エレクトロポレーション法を用いて、プラスミド pDP-CAT1 を常法どおりに *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 に導入し、形質転換体を得た。得られた形質転換体 10 株を選び、表1に示す最少平板培地と 100 mg/l の L-リジンを加えたリジン添加最少平板培地に塗布し、30 °C で3日間培養した。その結果、すべての形質転換体は、リジン添加最少平板培地でのみ生育が認められた。このことから得られた形質転換体がリジン要求性を有することが確認できた。得られた形質転換体から 10 株を選び、*Corynebacterium glutamicum* TR-DAP1 から TR-DAP10 と命名した。

【0050】

【表1】

表1 最少平板培地

| | | |
|--------------------------------------|-----|------|
| グルコース | 20 | g/l |
| 硫酸 | 10 | g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 10 | g/l |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.4 | g/l |
| FeSO ₄ ・7H ₂ O | 10 | mg/l |
| MnSO ₄ ・4H ₂ O | 8 | mg/l |
| チアミン塩酸塩 | 100 | μg/l |
| ビオチン | 300 | μg/l |
| 寒天 | 20 | g/l |
| (NaOHで、pH 7.0に中和) | | |

【0051】実施例2 (2,6-ピリジンジカルボン酸の生産その1)

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 (親株) と

実施例1で得られた*Brevibacterium lactofermentum* TR-DAP1からTR-DAP10を、3mlブイヨン培地(ニッスイ製)に1白金耳量を植菌し、30℃で一晩振盪培養した。また、同様に、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032(親株)と*Corynebacterium glutamicum* TR-DAP1から10を、3mlブイヨン培地(ニッスイ製)に1白金耳量を植菌し、30℃で一晩振盪培養した。得られた培養液を、500ml容エーレンマイヤーフラスコ中の2,6-ピリジンジカルボン酸生産培地(表2)30mlに加え、30℃で3日間回転振盪培養した。得られた培養液から、遠心分離(4℃、6,000rpm)によって菌体を除去し、上清中の2,6-ピリジンジカルボン酸をHPLCで分析した結果を表3に示した。この表から分かるように、親株の培養上清には2,6-ピリジンジカルボン酸は検出されなかったが、実施例1で得られた形質転換体の培養上清すべてにおいて、2,6-ピリジンジカルボン酸が検出された。

*【0052】

【表2】

表2 2,6-ピリジンジカルボン酸生産培地

| | | |
|--------------------------------------|-----|------|
| グルコース | 100 | g/l |
| 硫酸 | 40 | g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 1.0 | g/l |
| MgSO ₄ ・7H ₂ O | 0.4 | g/l |
| FeSO ₄ ・7H ₂ O | 10 | mg/l |
| MnSO ₄ ・4H ₂ O | 8 | mg/l |
| チアミン塩酸塩 | 200 | μg/l |
| ビオチン | 300 | μg/l |
| L-アスパラギン酸 | 5 | g/l |
| CaCO ₃ | 40 | g/l |

(NaOHで、pH7.0に中和)

【0053】

【表3】

表3 形質転換体(リジン要求性株)による2,6-ピリジンジカルボン酸の生産

| 菌株名 | | | 2,6-ピリジンジカルボン酸(g/L) |
|--------------------------------------|-----------|------|---------------------|
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> | ATCC13889 | 比較例 | 0.0 |
| | TR-DAP1 | 本発明例 | 3.6 |
| | TR-DAP2 | | 3.1 |
| | TR-DAP3 | | 2.6 |
| | TR-DAP4 | | 3.1 |
| | TR-DAP5 | | 2.8 |
| | TR-DAP6 | | 3.3 |
| | TR-DAP7 | | 3.2 |
| | TR-DAP8 | | 2.7 |
| | TR-DAP9 | | 2.3 |
| | TR-DAP10 | | 2.9 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | ATCC13032 | 比較例 | 0.0 |
| | TR-DAP1 | 本発明例 | 2.8 |
| | TR-DAP2 | | 2.1 |
| | TR-DAP3 | | 2.9 |
| | TR-DAP4 | | 3.0 |
| | TR-DAP5 | | 2.2 |
| | TR-DAP6 | | 2.5 |
| | TR-DAP7 | | 2.9 |
| | TR-DAP8 | | 3.1 |
| | TR-DAP9 | | 2.4 |
| | TR-DAP10 | | 2.7 |

【0054】実施例3 (2,6-ピリジンジカルボン酸の単離)

50mlのブイヨン培地(ニッスイ製)を500ml容エーレンマイヤーフラスコに入れ、120℃、20分間滅菌したのち、ブイヨン寒天培地(ニッスイ製)に生育させた*Brevibacterium lactofermentum* TR-DAP1の1白金耳量を植菌し、30℃で一晩回転振盪培養した。得られた培養液を、表2から炭酸カルシウムを除いた2,6-ピリジンジカルボン酸生産培地1lを仕込んだ2l容ミニジャーファーメンターに植菌し、通気量1vvm、回転数800rpm、培養温度30℃、pH7.0の条件で通気攪拌培養を行った。得られた培養液から遠心分離(4℃、6,000rpm)によって菌体を除去し、培養上清950mlを得た。

【0055】培養上清900mlを、500mlカチオン交換樹脂ダイヤイオンSK-1B(三菱化学製)を充填したカラムに通液し、素通り画分を回収した。さらに、1lイオン交換水をカラムに通液し、カラム洗浄液約1lを得た。素通り画分と洗浄液を混合し、その混合液1lを、60℃で減圧濃縮したのち4℃で晶析した。得られた淡黄白色固体を水に溶解させ濃縮した後、再度、4℃で晶析することによって、白色固体の2,6-ピリジンジカルボン酸0.9gを得た。

【0056】また、ダイヤイオンSK-1Bの素通り画分と洗浄液の混合液1lを、NaOHで中和したのち、晶析によって淡黄白色の固体を得た。得られた固体を水に溶解後、再度4℃で晶析することによって、白色固体の2,6-ピリジンジカルボン酸ナトリウム塩1.1gを得

た。

【0057】これら、2,6-ピリジンジカルボン酸白色固体と2,6-ピリジンジカルボン酸ナトリウム固体について、HPLCで分析したところ、2,6-ルチジンや6-メチル-2-ピリジンカルボン酸などのアルキルピリジン類は検出されなかった。また、得られた2,6-ピリジンジカルボン酸およびそのナトリウム塩について、「新規化学物質等に係わる試験方法について（環保業5号・薬発第615号・49基局第392号）」に従って、生分解性を調べたところ、ほぼ100%の生分解されることが分かった。また、得られた2,6-ピリジンジカルボン酸およびそのナトリウム塩を、水に溶解後、全自動アミノ酸分析計（日本電子製、JLC200A）で分析したところ、アラニン、バリンが、それぞれ0.2%、0.3%含まれていた。

実施例4（ジピコリン酸シンターゼをコードする遺伝子の導入）

コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) のリボソームRNAをコードする遺伝子配列（参考文献4）を参考にオリゴヌクレオチド5'-GTGCTTAACACATGCAAGTCG-3'（配列番号：5）、5'-CTTCGTCCAATCGCGATCCC-3'（配列番号：6）を合成した。*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032株から常法に従い調整したゲノムDNAの溶液を増幅鋳型として0.2mlのマイクロ遠心チューブに0.2μlづつ取り、各プライマーを20pmol、20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）、2.5mM KCl、100μg/mlゼラチン、50μM各dNTP、2単位 LATAq DNAポリメラーゼ（宝酒造製）となるように各試薬を加え、全量を50μlとした。DNAの変性条件を94℃、30秒、プライマーのアニーリング条件を55℃、30秒、DNAプライマーの伸長反応条件を72℃、3分の各条件でBioRad社のサーマルサイクラーを用い、30サイクル反応させた（ポリメラーゼ連鎖反応：以後、PCR法と記す）。尚、本実施例におけるPCR法は特に断らない限り、本条件にて行った。このPCR法により得られた産物を1%アガロースにて電気泳動し、16S-rRNAを含む約1.6kbのDNA断片を常法に従い調整した。この断片を、プラスミドベクターpT7blue（Novagen社製）のEcoRV部位の3'-末端にT塩基が付加された間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入し、得られたプラスミドをpT7-16SCGと命名した。

【0058】ブレビバクテリウム ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869株のdapB遺伝子近傍のDNA配列（参考文献1）を参考に、オリゴヌクレオチド5'-CAGAGGTTGTAGGCGTTGAG-3'（配列番号：7）、5'-TATGCTCCTTCATTTCGTG-3'（配列番号：8）を合成した。*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869株から調整した

ゲノムDNAを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号：7）、（配列番号：8）をプライマーセットとして用いたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、dapB遺伝子上流領域を含む0.3kbのDNA断片を常法に従い調整した。この断片を、プラスミドベクターpT7blueのEcoRV部位の3'-末端にT塩基が付加された間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入し、得られたプラスミドをpT7-dapBUSと命名した。パチルス サチルス (*Bacillus subtilis*) ATCC6051株のジピコリン酸シンターゼのサブユニットA（dapA）、及びサブユニットB（dapB）をコードする遺伝子のDNA配列（参考文献5）を参考に、オリゴヌクレオチド5'-GGAGCATAATGTTAACCGGATTGAAAATT-3'（配列番号：9）、5'-CGCGGATCCAAAACCTCTCCGCCAATCA-3'（配列番号：10）を合成した。*Bacillus subtilis* ATCC6051株から調整したゲノムDNAを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号：9）、（配列番号：10）をプライマーセットとして用いたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、dapA、及びdapB遺伝子を含む1.6kbのDNA断片を常法に従い調整した。この断片を、プラスミドベクターpT7blueのEcoRV部位の3'-末端にT塩基が付加された間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入し、得られたプラスミドをpT7-dapABと命名した。

【0059】pT7-dapBUSを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号：7）、（配列番号：8）をプライマーセットとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、dapB遺伝子上流領域を含む0.3kbのDNA断片を常法に従い調整した。また、pT7-dapAB増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号：9）、（配列番号：10）をプライマーセットとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、dapA、及びdapB遺伝子を含む1.6kbのDNA断片を常法に従い調整した。ここで得られた0.3kb断片、1.6kb断片を混合したものを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド（配列番号：7）、（配列番号：10）をプライマーセットとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動して、dapB遺伝子上流領域とdapA、及びdapB遺伝子が連結された1.9kbのDNA断片を常法に従い調整した。この断片を、プラスミドベクターpT7blueのEcoRV部位の3'-末端にT塩基が付加された間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入し、得られたプラスミドをpT7-dapBUS-dapABと命名した。

【0060】pT7-16SCGを増幅鋳型とし、オリゴヌクレオチド5'-GAATTCGTGCTTAACACATGCAAGTCG-3'（配列番号：11）、5'-CAACTCTCAGTCTCCCTACA

10

20

30

40

50

GCACTC-3' (配列番号: 12) をプライマーセットとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、16S-rRNA遺伝子5'領域の一部分を含む0.6kbのDNA断片を常法に従い調整した。また、pT7-dapBUS-dpaAB増幅型とし、オリゴヌクレオチドGGAGACTGCAGAGTTGTAGCGTTGAG (配列番号: 13)、CGCGGATCCAAACTCCTTCGCCAATCA (配列番号: 14) をプライマーとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、dapB遺伝子上流領域とdpaA、及びdpaB遺伝子が連結された1.9kbのDNA断片を常法に従い調整した。ここで得られた0.6kb断片、1.9kb断片を混合したものを増幅型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号: 11)、(配列番号: 14) をプライマーとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動して、16S-rRNA遺伝子の一部分、dapB遺伝子上流領域とdpaA、及びdpaB遺伝子が連結された2.5kbのDNA断片を常法に従い調整した。この断片を、プラスミドベクターpT7blueのEcoRV部位の3'-末端にT塩基が付加された間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入し、得られたプラスミドをpT7-16S-dpaABと命名した。

【0061】カナマイシン耐性遺伝子のDNA配列 (参考文献6) を参考にオリゴヌクレオチド5' - CGCGGATCCCTTGTGTAGGTGGAC -3' (配列番号: 15)、5' - ACGGTGACTTGACGGGACGGCTGGTGGT -3' (配列番号: 16) を合成した。プラスミドpHSG298を増幅型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号: 15)、(配列番号: 16) をプライマーセットとしたPCR法により得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動し、カナマイシン耐性遺伝子を含む1.1kbのDNA断片を常法に従い調整した。また、pT7-16SCGを増幅型とし、オリゴヌクレオチド5' - GCATTTCACGCTACACCGCGTCCC G -3' (配列番号: 17)、5' - CGCAAGCTTCTTCGTCAA TCGCCGATCCC -3' (配列番号: 18) をプライマーセットとしたPCR法によって得られた産物を産物を1%アガロースゲル電気泳動し、16S-rRNA遺伝子の一部分を含む1kbのDNA断片を常法に従い調整した。ここで得られた1.1kb断片、1kb断片を混合したものを増幅型とし、オリゴヌクレオチド (配列番号: 15)、(配列番号: 18) をプライマーセットとしたPCR法によって得られた産物を1%アガロースゲル電気泳動して、16S-rRNA遺伝子3'領域の一部分が連結された1.1kbのDNA断片を常法に従い調整した。この断片を、プラスミドベクターpT7blueのEcoRV部位の3'-末端にT塩基が付加された間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入し、得られたプラスミドをpT7-Km-16Sと命名した。

【0062】pT7-16S-dpaABをEcoR

I、及びBamHIで消化した産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、16S-rRNA遺伝子の5'領域の一部分、dapB遺伝子上流領域、及びdpaA、dapB遺伝子を含む2.5kbのDNA断片を調整した。また、pT7-Km-16SをBamHI、及びHindIIIで消化した産物を1%アガロースゲルにて電気泳動し、カナマイシン耐性遺伝子、及び16S-rRNA遺伝子の3'領域の一部分を含む2.1kbのDNA断片を調整した。ここで得られた2.5kb、2.1kbDNA断片を、予めEcoRI、及びHindIIIで消化しておいたプラスミドベクターpUC19のEcoRI/HindIII間隙に、常法に従ったライゲーション反応により挿入した。この操作で得られたプラスミドをpUC-16S-dapABと命名した。

【0063】エレクトロポレーション法を用いて、プラスミドpUC-16S-dapABを常法どおりにBrevibacterium lactofermentum ATCC13869に導入したところ、カナマイシンに耐性を示すようになった形質転換体を得た。得られた形質転換体から10株を選定し、常法に従い各株由来のゲノムDNA溶液を調整した。このゲノムDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチド (配列番号: 11)、(配列番号: 14) をプライマーセットしたPCR法を行い、得られた産物を1%アガロースゲルにて電気泳動したところ、すべての株由来の産物から2.5kbの単一のバンドが観察された。このことから、16S-rRNA遺伝子座に、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子 (dpaA、及びdpaB) が挿入されていることが確認できた。これら形質転換体を、Brevibacterium lactofermentum TR-DPA1からTR-DPA10と命名した。

【0064】また、エレクトロポレーション法を用いて、プラスミドpUC-16S-dapABを常法どおりにCorynebacterium glutamicum ATCC13032に導入したところ、カナマイシンに耐性を示すようになった形質転換体を得た。得られた形質転換体から10株を選定し、常法に従い各株由来のゲノムDNA溶液を調整した。このゲノムDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチド (配列番号: 11)、(配列番号: 14) をプライマーセットとして用いたPCR法を行い、得られた産物を1%アガロースゲルにて電気泳動したところ、すべての株由来の産物から2.5kbの単一のバンドが観察された。このことから、16S-rRNA遺伝子座に、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子 (dpaA、及びdpaB) が挿入されていることが確認できた。これら形質転換体を、Corynebacterium glutamicum TR-DPA1からTR-DPA10と命名した。

【0065】更に、実施例1で得られたリジン要求性株Brevibacterium lactofermentum TR-DAP1、及びCorynebacterium glutamicum TR-DAP1に、常法に従ったエレクトロポレーション法により、プラスミド

10

20

30

40

50

pUC-16S-dapABを導入した。その結果、カナマイシンに対して耐性を示すようになった形質転換体を得た。これら得られた形質転換体からそれぞれ10株を選定し、常法に従い各株由来のゲノムDNA溶液を調整した。このゲノムDNAを鋳型として、オリゴヌクレオチド（配列番号：11）（配列番号：14）をプライマーセットとして用いたPCR法を行い、得られた産物を1%アガロースゲルにて電気泳動したところ、すべての株由来の産物から2.5kbの単一のバンドが観察された。このことから、得られた形質転換体のすべてが、16S-rRNA遺伝子座に、ジピコリン酸シンターゼ遺伝子（dapA、及びdapB）が挿入されていることが確認できた。これら形質転換体を、それぞれBrevibacterium lactofermentum TR-DDP1からTR-DDP10、及びCorynebacterium glutamicum TR-DDP1からTR-DDP10と命名した。実施例5

（2,6-ピリジンジカルボン酸の生産その2）Brevibacterium lactofermentum ATCC13869（親株）と実施例4で得られたBrevibacterium lactofermentum TR-DPA1からTR-DPA10、及びBrevibacterium lactofermentum TR-DDP1からTR-DDP10を3mlブイヨン培地（ニッスイ製）に1白金耳を植菌し、30℃で一晩培養した。また、Corynebacterium glutamicum ATCC13032（親株）と実施例4で得られたCoryn*

*ebacterium glutamicum TR-DPA1からTR-DPA10、及びCorynebacterium glutamicum TR-DDP1からTR-DDP10を3mlブイヨン培地（ニッスイ製）に1白金耳を植菌し、30℃で一晩培養した。それぞれ得られた培養液を、500ml容エルリンマイヤーフラスコ中の2,6-ピリジンジカルボン酸生産培地（2）（表4）30mlに加え、30℃で3日間回転振とう培養した。得られた培養液から、遠心分離（4℃、遠心加速度：6000g）によって、菌体を除去し、上清中の2,6-ピリジンジカルボン酸をHPLCで分析した結果を表5および表6に示した。この結果、親株の培養液上清からは、2,6-ピリジンジカルボン酸は検出されなかったが、実施例で得られた形質転換体の培養上清すべてにおいて、2,6-ピリジンジカルボン酸が検出された。また、すべての形質転換体培養上清に含まれるアルキルピリジンの含有量は2重量%以下であった。更に、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ遺伝子を破壊していない形質転換体と比較して、ジヒドロピコリン酸レダクターゼ遺伝子が破壊された形質転換体の方が培養上清中に2,6-ピリジンジカルボン酸が高い濃度で検出されることを確認した。

【0066】

【表4】

表4 2,6-ピリジンジカルボン酸生産培地2

| | | |
|--------------------------------------|-----|------|
| グルコース | 100 | g/l |
| 硫安 | 40 | g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 1.0 | g/l |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.4 | g/l |
| FeSO ₄ ·4H ₂ O | 10 | mg/l |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 8 | mg/l |
| D,L-ジアミノピメリン酸 | 100 | mg/l |
| チアミン塩酸塩 | 200 | μg/l |
| ビオチン | 300 | μg/l |
| 大豆タンパク加水分解物 | 25 | g/l |
| L-アスパラギン酸 | 5 | g/l |
| CaCO ₃ | 40 | g/l |
| (NaOHで、pH7.0に中和) | | |

【0067】

40 【表5】

表5 形質転換体による2,6-ピリジンジカルボン酸の生産

| 菌株名 | | | 2,6-ピリジンジカルボン酸 (g/L) |
|--------------------------------------|-----------|------|----------------------|
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> | ATCC13869 | 比較例 | 0.0 |
| | TR-DPA1 | 本発明例 | 3.2 |
| | TR-DPA2 | | 3.5 |
| | TR-DPA3 | | 2.6 |
| | TR-DPA4 | | 3.2 |
| | TR-DPA5 | | 3.5 |
| | TR-DPA6 | | 2.9 |
| | TR-DPA7 | | 2.5 |
| | TR-DPA8 | | 2.8 |
| | TR-DPA9 | | 2.9 |
| | TR-DPA10 | | 3.2 |
| <i>Brevibacterium lactofermentum</i> | TR-DDP1 | 本発明例 | 7.3 |
| | TR-DDP2 | | 8.9 |
| | TR-DDP3 | | 10.0 |
| | TR-DDP4 | | 9.5 |
| | TR-DDP5 | | 7.6 |
| | TR-DDP6 | | 8.4 |
| | TR-DDP7 | | 6.3 |
| | TR-DDP8 | | 7.3 |
| | TR-DDP9 | | 6.5 |
| | TR-DDP10 | | 8.1 |

【0068】

* * 【表6】

表6 形質転換体による2,6-ピリジンジカルボン酸の生産

| 菌株名 | | | 2,6-ピリジンジカルボン酸 (g/L) |
|-----------------------------------|-----------|------|----------------------|
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | ATCC13032 | 比較例 | 0.0 |
| | TR-DPA1 | 本発明例 | 2.6 |
| | TR-DPA2 | | 2.2 |
| | TR-DPA3 | | 2.5 |
| | TR-DPA4 | | 2.7 |
| | TR-DPA5 | | 2.6 |
| | TR-DPA6 | | 2.9 |
| | TR-DPA7 | | 3.0 |
| | TR-DPA8 | | 3.0 |
| | TR-DPA9 | | 2.7 |
| | TR-DPA10 | | 2.8 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | TR-DDP1 | 本発明例 | 7.2 |
| | TR-DDP2 | | 7.8 |
| | TR-DDP3 | | 6.4 |
| | TR-DDP4 | | 8.5 |
| | TR-DDP5 | | 8.3 |
| | TR-DDP6 | | 7.7 |
| | TR-DDP7 | | 6.1 |
| | TR-DDP8 | | 6.6 |
| | TR-DDP9 | | 7.1 |
| | TR-DDP10 | | 7.9 |

【0069】

【発明の効果】本発明によれば、生分解性に優れた2,6-ピリジンジカルボン酸またはその塩を提供することができる。

参考文献

1. Pisabarro, A. et. al J. Bacteriol. 175: 2743-2749 (1993)

2. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982.

4. Tauch, A. et. al FEMS Microbiol. Lett. 201: 53-58. (2001)

5. Daniel, R.A. and Errington, J. J. Mol. Biol. 232: 468-483. (1995)

50 6. Takeshita, S. et. al Gene 61: 63-74. (198

7)

【0070】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 東レ株式会社 (Toray Industry Inc.)

<120> 2, 6-ピリジンジカルボン酸またはその塩、
製造方法ならびにキレート剤

<130> 5 1 E 1 6 4 9 1

<160> 18

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gcttctagac tggtaggcgt ttgaaaaact 30

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

gctaagcttc acgctatcaa ctccacgctc aat 33

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

acggtcgact cgcagaataa ataaatcctg gtg 33

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

atgaggcctg agaggcgggt ttgcgtattg ga 32

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gtgcttaaca catgcaagtc g 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cttcgtccaa tcgccgatcc c 21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

(13)

特開2002-371063

24

cagaggttgt aggcgttgag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

tatgctcctt cattttcgtg 20

<210> 9

<211> 29

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ggagcataat gttaaccgga ttgaaaatt 29

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

cgcgatcca aaactccttc cgccaatca 29

20 <210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gaattcgtgc ttaacacatg caagtcg 29

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <400> 12

caactctgca gtctccccta cagcactc 28

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

ggagactgca gaggttgtag gcgttgag

<210> 14

<211> 29

40 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

cgcgatcca aaactccttc cgccaatca

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

cgcgatccc ttgttgtagg tggac 25

50 <210> 16

(14)

特開 2002-371063

25

26

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 16
 acgctgactt gacgggacgg ctggtggt 28
 <210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

* <400> 17
 gcatttcacc gctacaccag ccgtcccg 28
 <210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 18
 cgcaagcttc ttcgtccaat cgccgatccc 30

*

 フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | タームコード (参考) |
|--------------------------|--------|---------|-------------|
| C 1 2 R | 1:185) | C 1 2 R | 1:15 |
| (C 1 2 P | 17/12 | | 1:07 |
| C 1 2 R | 1:13) | C 1 2 R | 1:01 |
| (C 1 2 P | 17/12 | | 1:425 |
| C 1 2 R | 1:15) | C 1 2 R | 1:80 |
| (C 1 2 P | 17/12 | | 1:85 |
| C 1 2 R | 1:07) | C 1 2 N | 15/00 |
| (C 1 2 P | 17/12 | | Z N A A |
| C 1 2 R | 1:01) | | |
| (C 1 2 P | 17/12 | | |
| C 1 2 R | 1:425) | | |
| (C 1 2 P | 17/12 | | |
| C 1 2 R | 1:80) | | |
| (C 1 2 P | 17/12 | | |
| C 1 2 R | 1:85) | | |

(72)発明者 越後 裕司
 愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東
 レ株式会社名古屋事業場内

F ターム (参考) 4B024 AA03 BA07 BA08 CA04 DA05
 EA04 GA14 HA01
 4B064 AE49 CA02 CA05 CA06 CA19
 CC24 DA16
 4C055 AA01 BA03 BA57 CA01 DA01
 GA02